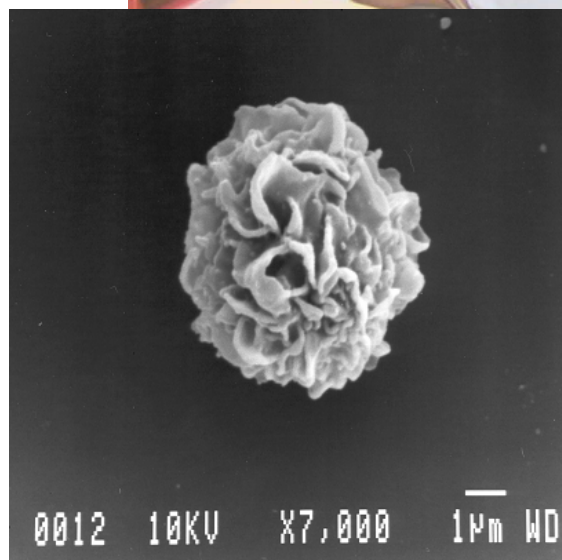


Kvalitetssikring av elutriatorrensede, kryopreserverte humane monocytter til forskningsformål



Figur 1 Marius Osaland Muis (v.), Gun Britt Joø, Øyvind Steinsbø (h.)



Figur 2 Monocytt. Elektronmikroskopi, Ellen Namork.

Marius Osaland Muis &
Øyvind Steinsbø

Sideoversikt

1. Abstract
2. Målet med oppgaven
3. Innledning
 - 3.1. *Monocytt*
 - 3.2. *LPS*
 - 3.3. *Stimulerte monocytt*
 - 3.4. *Tumor Nekrosefaktor alfa (TNF- α)*
 - 3.5. *Aterosklerose*
 - 3.6. *Sepsis*
 - 3.7. *Isolering og kvalitetssikring av humane monocytt*
4. Materialer
 - 4.1. *Reagenser*
 - 4.2. *Utstyr*
 - 4.3. *Instrumenter*
5. Metoder
 - 5.1. *Blodbanken*
 - 5.2. *Monocyttilisering*
 - 5.2.1 *Tetthetssentrifugering*
 - 5.2.2 *Elutriatorsentrifugering*
 - 5.2.3 *Flowcytometri*
 - 5.3. *Celletelling*
 - 5.4. *Nedfrysing av celler*
 - 5.5. *Opptining av celler*
 - 5.6. *Monocytstimering: test av celler til PCA og TNF- α , nedfrysing av TNF- α*
 - 5.7. *Opptining av supernatant med TNF- α*
 - 5.8. *TNF- α EASIA (ELISA)*
6. Resultater
7. Diskusjon

Både Resultater og Diskusjon inneholder følgende:

X.1. Våre TNF- α målinger

- | | |
|--------|---|
| X.1.1. | Stimulerte vs. Ustimulerte monocytt. |
| X.1.2. | In vitro LPS-stimulert fullblod. |
| X.1.3. | Donorvariasjon. |
| X.1.4. | Hvor gode er målingene våre?
Har vi blitt bedre til å gjennomføre eksperimentet med tiden? |
| X.1.5. | Kan våre resultater sammenlignes med gruppens resultater? |
| X.1.6. | Kan vi sammenligne våre tall innbyrdes? |

X.2. Kalibrering av leser. Etablering og sikring av standardkurven.

- | | |
|--------|--------------|
| X.2.1. | 0-prøven. |
| X.2.2. | Standardene. |
| X.2.3. | Kontrollene. |

8. Ettertanke
9. Appendix

1) Abstract

Background

Since 1993, the Research and Development Group (R&D), at the Department of Clinical Chemistry, Ullevaal University Hospital, has had a routine for isolation (elutriation, centrifugation) and cryopreservation of human monocytes from whole blood for research purposes.

Aim

This project's aim has been to quality check a particular step (monocyte responsiveness to LPS stimulation) in this routine (see Background and Flow chart).

Our personal aims have been the following: Get familiar with laboratory work, i.e. pipetting, ELISA quantification, flow cytometry and elutriation (sections 2.1, 2.2, 2.5). Learn how to evaluate data statistically (2.3). Acquire knowledge of the monocyte's role in atherogenesis and sepsis (2.4).

Materials and methods

Isolated and cryopreserved monocytes were thawed and stimulated with LPS. In parallel non-stimulated monocytes were examined. The supernatants were subsequently analysed for TNF-alpha by use of a commercial ELISA kit.

In a separate experiment we measured TNF-alpha in heparinplasma from *in vitro* LPS-stimulated whole blood.

Results

We showed that LPS-stimulated monocytes produced TNF-alpha (mean: 1200 pg/ml/12.500 cells), while unstimulated monocytes did not. TNF-alpha production was higher in *in vitro* LPS stimulated whole blood (mean: 8000pg/ml) than in supernatants from LPS stimulated isolated monocytes. The TNF-alpha production of monocytes from different donors differed (Range: 1000-1800 pg/ml/12.500 cells) although they were treated in a similar manner. Our results became better as we practised and built up our skills (Variation Coeff. down). Our TNF-alpha measurements were comparable, but our results tended to lie systematically lower than the results from the R&D-group.

Discussion

The fact that monocytes produced TNF-alpha as a response to LPS stimulation, while unstimulated did not, indicated that the isolation and cryopreservation routine had been successful, and that the monocytes kept their viability.

Probable explanation for the higher TNF-alpha production in whole blood: more monocytes were stimulated by a higher LPS concentration.

The donor variation could be explained by analytical or biological variations. The R&D-group also found donor variations. They have grouped their samples into "high-" and "low-responders". Since no longitudinal cell controls were run, no final conclusion as to donorvariation could be given.

The reason why our results systematically lie under the R&D-groups' is probably because we used supernatants that were frozen stored and thawed, while the R&D-group used fresh supernatant ($T_{1/2}$ TNF-alpha).

2)

Målet med oppgaven

Gjennom flere år har FOU-seksjonen i Klinisk kjemisk avdeling ved Ullevål Universitetssykehus arbeidet med å kartlegge humane monocytters rolle i sepsis og hjertekarsykdom.

I vårt valg av prosjektoppgave kom vi til enighet med Peter Kierulf om oppgave her. Her har vi undersøkt monocytters kvalitet etter gjennomgått elutriatorsentrifugering og kryopreservering.

Vi har altså gått inn i en forskergruppe som arbeider med humane monocytter i kultur og selv satt opp en av de metodene som FOU-seksjonen bruker for å kvalitetssikre sine rensede monocytter før de brukes i forskningsøyemed (se Flow chart, neste side).

Våre egne mål var følgende:

1. *Få innblikk i planlegging og praktisk utføring av eksperimentell forskning.*
Vi valgte en eksperimentell oppgave for å få et innblikk i translasjonsforskning (skjæringspunktet mellom basal- og klinisk forskning). Det ville være en fin erfaring å lære seg hvordan man planlegger og utfører eksperimenter. Ved et eventuelt seinere forskningsprosjekt, ville vi sitte med en erfaring som ville kunne gjøre arbeidet lettere.
2. *Se moderne forskningsverktøy i bruk.*
Vi fikk se og ta i bruk en rekke moderne metoder og utstyr: sentrifuge, elutriator, tellekammer, celle tellemaskin, flowcytometer, ELISA-kit. Dermed ville vi se hva de ulike metodene kan brukes til, noe vi anser som nyttig da vi senere kommer til å rekvirere prøver som bl.a. hviler på slike metoder.
3. *Bearbeide våre måleresultater med enkle statistiske metoder.*
I et eksperimentelt forsøk står statistikk sentralt. Gjennom vårt arbeid ville vi måtte sette oss inn i statistiske metoder og vurdering av data. Dette vil være nyttig ved senere vurdering av vitenskapelige artikler.
4. *Bedre vår generelle forståelse av sepsis og immunologi ved lesing av litteratur på feltet.*
Vi håpet å få en bedre oversikt over monocytters egenskaper og hvilken rolle den har i en infeksjonsrespons. Dette vil kunne hjelpe oss til bedre å forstå filosofien bak ulike behandlingsprinsipper innenfor immunologi og infeksjon.
5. *Trene på en logisk og systematisk fremstilling av et felt.*
I resultater og diskusjon ble vi nødt til å trene på å fremstille våre resultater logisk og systematisk. Dette håper vi vil være til hjelp i evt. seinere arbeider.

Flow chart

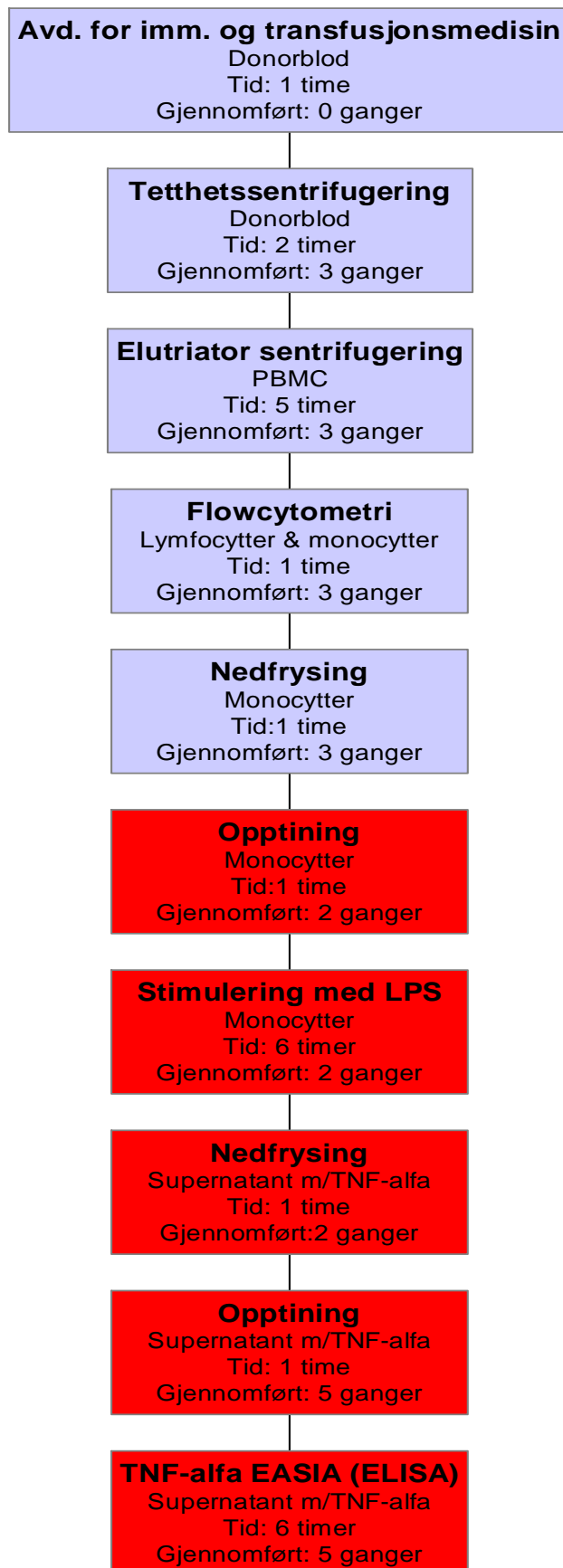
Oversikt over 5) Metoder.

DAG 1

DAG 2

PRODUKSJONSDIAGRAM

Blå: observert. Rød: gjennomført selvstendig



3)

Innledning

Nedenfor har vi valgt å omtale monocytt, LPS og TNF- α fordi disse aspekter står sentralt i den eksperimentelle del av oppgaven. I tillegg har vi valgt å omtale sepsis og aterosklerose fordi monocytter spiller en sentral rolle i utviklingen av disse, og fordi disse sykdommene er alvorlige og hyppig forekommende. Til slutt nevner vi kvalitetskrav knyttet til monocytter som brukes i eksperimenter.

3.1. MONOCYTTER

Monocytter er en del av den medfødte immunitet. Medfødt (eller non-adaptiv) immunitet er nedarvede egenskaper som individet har fra fødselen av. Medfødt infeksjonsresistens trenger ingen "læring" og trer i funksjon første gang individet eksponeres for en mikroorganisme. Den ervervede infeksjonsresistens består bla. av antistoffer. Disse bindes til mikroorganismene og gjør dem dermed "lettere" å finne for monocytene.

Monocytter er derivert fra den myeloide cellerekken i rød beinmarg. Utviklingen står under innflytelse av en rekke cytokiner kalt kolonistimulerende faktorer (M-CSF).

De utgjør mellom 2-10 % av leukocytter i blod, de er store (12-15 μ m), har nyreformet kjerne og særpreges av at de uttrykker CD 14ⁱ. Det anslås at det daglig frisettes 5 milliarder monocytter til blodbanen. Under infeksjon økes produksjonen ytterligereⁱⁱ.

Når monocytter, etter 2-3 dager i blodbanen går ut i vevet, differensieres de som regel til makrofager eller dendritiske celler.

Makrofager har en viktig rolle som igangsettere av betennelsesreaksjoner ved infeksjoner. Bakgrunnen er at makrofager har flere reseptorer for bakterieprodukter, f.eks. LPS-reseptor (CD 14), toll-liknende reseptorer (TLR) og mannosereseptorⁱⁱⁱ. Når bakterieprodukter bindes til disse reseptorene fører det til en aktivering av cellen med produksjon av proinflammatoriske cytokiner som TNF- α , IL 1 og IL 6. Betennelsesreaksjonen forårsaker monocyttmigrasjon til infeksjonsfokus, med påfølgende differensiering av monocytter til makrofager.

Makrofager har en stor fagocytoseaktivitet. Pseudopodier omslutter partikler som for eksempel bakterier, og det dannes intracellulære vesikler, kalt fagosomer. Fagosomene fusjonerer med lysosomer til fagolysosomer, og det fagocyterte materialet (bakterier) blir brutt ned.

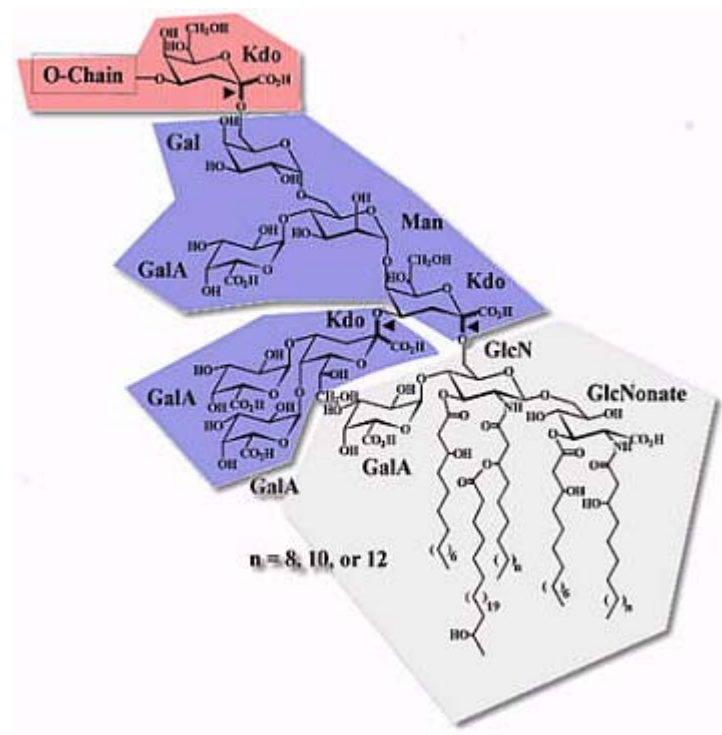
Binding av antistoff til infeksiose mikroorganismer og aktivering av komplement øker makrofagenes fagocytose. Årsaken er at makrofager har Fc reseptor og komplement reseptorer som binder antistoff og komplementfaktorer som sitter bundet til bakterier og virus. Makrofagene er også antigenpresenterende celler (APC).

3.2. LPS

Endotoxin (også kalt LPS, lipopolysakkarid) finnes i den ytterste celleveggen av de to veggene på gram-negative bakterier. Dette er et amfipatisk molekyl, dvs. den har både hydrofile og hydrofobe ender^{iv}.

LPS består av tre komponenter, hvor den viktigste delen er et membran-anker, kalt lipid A. Det er lipid A som er ansvarlig for de LPS-medierte effektene.

Man har forsøkt å utnytte dette i behandlingsøyemed, ved å bruke syntetisk lipopolysakkarid (derivert fra *R. Saphaeroides*, kalt E5564) designet for å motvirke den toksiske effekten til lipid A^v.



Figur 3 viser LPS-struktur. Grått = lipid A.

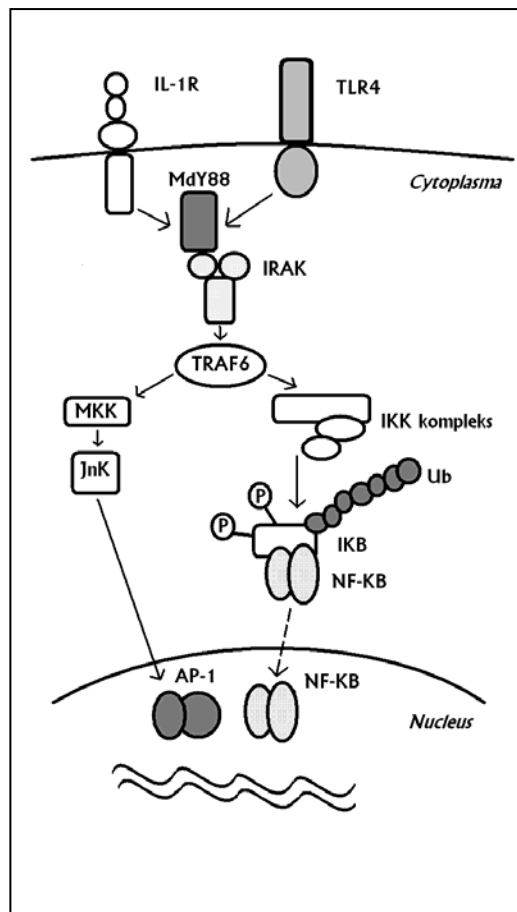
3.3. Stimulering av monocytytter

Monocytytter har spesifikke reseptorer – Pattern recognition receptors, PRR. Disse kan reagere med bakterieveggenes forskjellige overflatestrukturer – pathogen associated molecular patterns, PAMP. CD14 og TLR er typiske PRR. Lipopolysakkarid (LPS) er typisk PAMP. Når PAMP binder seg til PRR, aktiveres monocytytten.

LPS, i kompleks med LPS-bindende protein (LBP), binder seg til reseptoren CD14, som deretter interagerer med reseptorkomplekset TLR4/MD-2^{vi}. Forsøk antyder at alle disse fire; LBP, CD14, TLR4 og MD-2, må virke sammen i et kompleks for at monocytytten skal bli aktivert av LPS^{vii}.

CD14 er forankret i cellemembranen ved glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) og mangler dermed intracellulær hale. CD14 kan derfor ikke aktivere monocytytten direkteⁱⁱ.

Det er TLR4 (ett av mange TLR – det finnes mange ulike TLR!^{viii}) som er ansvarlig for den LPS-spesifikke intracellulære signaliseringen^{viii, ix}. TLR4 og IL-1-reseptor har samme cytoplasmatiske domene; the Toll/IL-1R (TIR) domain. Intracellulær signalisering ved aktivering av disse ulike reseptorene er derfor stort sett like.



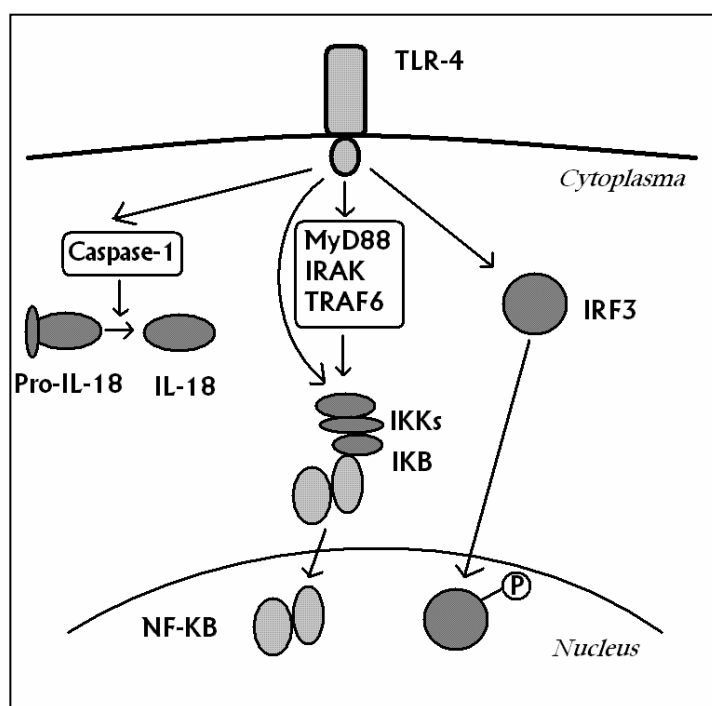
Figur 4 viser Toll/IL-1R (TIR) og intracellulære signalisering

Spesielt viktig er aktivering av NF- κ B som initierer transkripsjon av en rekke inflammatoriske mediatorer. Disse genene kalles "early immediate genes". TIR aktiverer også AP-1. AP-1 binder seg til promotor-regionene til mange gener som er involvert i celleproliferasjon (cfr. Figur 4).

Både NF- κ B og AP-1 aktiveres via MyD88-avhengig signalvei. MyD88, Myeloid Differentiation protein, har et TIR domene som gjør at det blir aktivert ved LPS-stimulering. Forsøk med MyD88^{-/-} makrofager viser dog at en MyD88-uavhengig signalvei finnes. Også her vil NF- κ B aktiveres (cfr. Figur 5).

En oversikt hentet fra Nature^{viii}.

MyD88-avhengig signalvei	MyD88-uavhengig signalvei
Cytokinproduksjon	IFN-induserbare gen-ekspressjoner
	Caspase-aktivering
Kostimulatorisk molekyl-induksjon	Kostimulatorisk molekyl-induksjon
<i>Resultat: Cytokinproduksjon</i>	<i>Apoptose</i>



Figur 5 viser MyD88-avhengig og MyD88-uavhengig signalvei

3.4. Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)

TNF- α er et proinflammatorisk cytokin som vesentlig produseres av monocytytter, men også av lymfocytter og granulocytterⁱ. TNF- α spiller en sentral rolle i immunresponsen i forhold til bakterier, sopp, virus og noen typer parasitter. I tillegg er det svært viktig i forbindelse med nekrose av spesielle tumortyper (cytolyse) og ved inflammasjoner. TNF- α er et akuttfaseprotein som initierer en cytokinkaskade og øker karpermeabiliteten, som rekrutterer makrofager og nøytrofile til infeksjonsfokus. Eksogene og endogene faktorer fra mange typer agens stimulerer til TNF- α produksjon. LPS fra bakterienes cellevegg er en svært potent stimulator for TNF- α produksjon i bl.a. monocytytter^x.

Høy TNF- α produksjon kan være assosiert med fatalt utkomme, som f.eks. ved meningokokk sepsis.

3.5. Aterosklerose

Monocytytter tiltrekkes.

Monocytytter står sentralt i aterogenesen. I den rådende hypotesen ser man for seg at skade på endotelet i elastiske (aorta, a. carotis, a. iliaca) og i store muskulære arterier stimulerer til produksjon av leukocyttiltrekkende molekyler (bl.a. Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1). Disse oppregulerer integriner på endotelceller og aktiverer reseptorer på rullende monocytytter. Monocyttenes aktiverte reseptorer interagerer med endotelets integriner og fører til en integrin-avhengig adhesjon av monocyttene til endotelet. Monocyttene tar seg så gjennom endotelet ved hjelp av diapedese.

Monocytytter modnes.

Når monocyttene kommer inn til intima, modnes de til makrofag under påvirkning av cytokinet macrophage colony-stimulating factor, M-CSF.

Monocytytter aktiveres.

Det skadde endotelet tiltrekker seg også andre leukocytter. Blant disse er Th1 og Th2 lymfocytter. I aterosklerotiske plakk finner man at Th1 har økt produksjon av interferon (IFN) γ . Dette cytokinet fører til aktivering av Jak-STAT Signaling Pathway i makrofager med en etterfølgende aktivering av makrofagene^{xi}.

Th1 cytokiner, IFN- γ , IL-2, TNF- α og TNF- β , er proinflammatoriske cytokiner. **Th2 cytokiner**, IL-4, IL-5 og IL-10, er anti-inflammatoriske. Th1 og Th2 cytokiner regulerer hverandre innbyrdes; IL-12 inhiberer Th2 mens IL-10 inhiberer Th1. Makrofager fremmer IFN- γ produksjon ved å skille ut IL-12. Dette fører til en polarisering mot Th1 og IFN- γ produksjon.

Foam cells.

IFN- γ fører til nedsatt kolesterol eksocytose fra makrofagene. Opphopning av kolesterol i makrofagene fører til utvikling av såkalte foam cells, skumceller.

Foruten å produsere kjemokiner som bl.a. rekrutterer andre leukocytter, utskiller makrofagene frie radikaler som oksiderer LDL. Dessuten utskiller de faktorer som stimulerer innvekst av glatte muskelceller (SMC). Innvekst av SMC markerer et skille: vi har da gått fra en reversibel (fatty streak) til en irreversibel (mature fibrofatty atheroma) fase i intima.

3.6. Sepsis

Sepsis er en tilstand med bakterier i blodet. Når disse bakteriene utskiller LPS, aktiveres makrofagene via TLR. Dette fører til at makrofagene skiller ut TNF- α , prostaglandiner og nitrogenmonoksid (NO). TNF- α trigger ytterligere NO produksjon i glatte muskelceller og i endotelceller. Høy NO-konsentrasjon gir nedsatt vaskulær tonus og nedsatt cardiac output (C.O). Økt karpermeabilitet fører til tap av serumproteiner og væske, som sammen med vasodilatasjon og nedsatt C.O. gir redusert blodtrykk^{xii}.

TNF- α fører også til at endotel uttrykker adhesjonsmolekyler og koagulasjonsfaktorer. Det dannes trombin som omdanner fibrinogen til det uløselige fibrin. Fibrinavleiring kan skje i mange karavsnitt med disseminert intravaskulær koagulasjon (DIC) som følge. Vi får petekkier og vevsnekrose.

TNF- α påvirker også Komplement systemet (alternativ aktiveringsvei), som aktiveres og gir inflammasjon som skader endoteletⁱ.

3.7. Isolering og kvalitetssikring av monocyttter

Monocyttter som skal brukes i eksperimenter, skal være mest mulig lik monocyttter slik de er *in vivo*. Dette for at resultater fra *in vitro* eksperimenter skal kunne brukes vitenskaplig.

For å få en ren fraksjon monocyttter, benyttet vi elutriatorsentrifugering og flowcytometri. Elutriatorsentrifugering ga oss monocyttfraksjoner, mens flowcytometri anslo renheten i fraksjonene.

Skal man studere monocytters funksjon, må de ikke aktiveres eller dø under isolasjonsprosessene.

For å kontrollere at monocytterne ikke var aktivert, benyttet vi TNF- α EASIA-målinger (ELISA). Vitalitet og celledød (apoptose og nekrose) undersøkte vi flowcytometrisk: Annexin V (apoptose) og Propidiumiodid, PI (nekrose).

Evne til respons på PAMP, målte vi som TNF- α -produksjon ved LPS-stimulering.

Er monocyttfraksjonen uren, aktivert eller mangler evne til å bli stimulert, kan disse ikke brukes i eksperimenter.

4)

Materialer

4.1. Reagenser

- DMSO, K₃-EDTA: Dimethylsulfoxid, K₃-EDTA. E. Merck (Darmstadt, Tyskland).
- EDTA-løsning: K₃-EDTA (15% w/v vandig løsning). Apoteket, Ullevål (Oslo, Norge).
- Elutrieringsbuffer: lages aseptisk før sterilfiltrering.

37,5 ml buffer fjernes, og 37,5 ml humant albumin 200mg/ml(0,5% w/v) (Octapharma, Blodbanken Oslo) tilsettes. pH justeres til 7,4. Sterilfiltreres i flasker, à 1000 og 500 ml. Disse tilsettes Garamycin, 2ml/liter. Settes i kjøleskap til neste dag. Innhold:

140 mM NaCl 9,2 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 1,3 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 13 mM Trisodiumcitrat 2H ₂ O 0,22% w/v NaHCO ₃ Sterilt vann ad 1500 ml.

- Føtalt kalveserum (FCS). Bio Whittaker (Verviers, Belgia). Varmet og syrebehandlet før bruk. Endotoxin-nivå <0,1 ng/mL.
- Garamycin 10 mg/ml. Schering-Plough (Brussel, Belgia).
- Lymphoprep. Axis-Shield, PoC A/S (Oslo, Norge).
- NaCl (0,9% w/v). B.Braun (Melsungen, Tyskland).
- Owrens barbitalbuffer. Apoteket, Ullevål (Oslo, Norge). pH 7,35.
- Penicillin-streptomycin. Solution stabilized P4458. Sigma (Taufkirchen, Tyskland).
- Residual plasma medium ingredients (RPMI). Gibco Life Technologies Ltd. (Paisley, Skottland). Endotoxin-nivå <0,1 ng/mL.
- E.Coli endotoxin (strain 055: B5, N185). Bio Whittaker (Verviers, Belgia)

4.2. Utstyr

- Bürkerkammer: GLASWAREN fabrik (Karl Hecht KG, Tyskland).
- Eppendorf rør: Micro Test Tubes 1,5 ml. Eppendorf (A-G, Tyskland).
- Falcon-rør: 50 ml Falcon-rør, 352070. Becton Dickinson (Franklin Lakes, N.J. USA).
- Nunc-rør: Cryotube 1,8 ml, nr 375418. Nunc A/S (Roskilde, Danmark).
- Plater til utsåing av celler: 96 Well Cell Culture Cluster Costar 3595. Corning Inc. (Corning, USA).
- TNF-α EASIA: TNF-α EASIA. BioSource Europe S.A. (Nivelles, Belgia).

4.3. Instrumenter

- ADVIA celledetektor: ADVIA 60. Bayer corp. (Tarrytown, NY, USA).
- Elutriator: Beckman JE-6B. Beckman instruments inc. (Palo Alto, California).
- Flowcytometer: FacSort. Becton Dickinson (Franklin Lakes, N.J. USA).
- VERSAmax mikrotiterplateleser: VERSAmax. Molecular Devices corp. (Sunnyvale, USA).

5)

Metoder

5.1. Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin

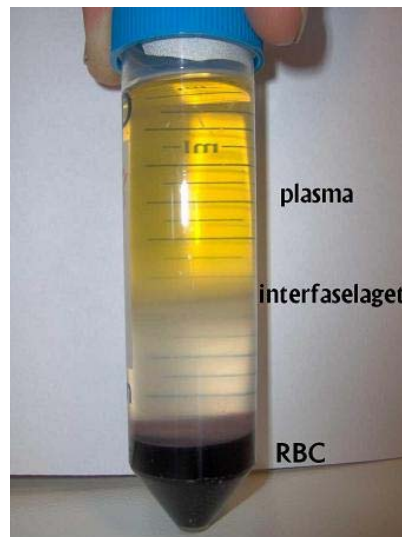
Bestill donorblod fra giver på avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin. Tom tappepose tilsettes 12µl EDTA-løsning/ml blod.

5.2. Monocyttisolering

Den nedenfor beskrevne metoden for å isolere monocytt, har FOU-seksjonen i Klinisk kjemisk avdeling benyttet i en årrekke^{xiii}, og har et monocytt-utbytte på ca 40%^{xiv}.

5.2.1. Tetthetssentrifugering

1. Pipetter 15ml NaCl 0,9% w/v og 15ml EDTA-blod i et Falcon-rør. Sett så en pipette med 15ml Lymphoprep i bunnen av røret (under NaCl og EDTA-blod) og pipetter innholdet sakte ned.
Gjenta i ca 30 Falcon-rør.
Sentrifugeres på 397 G, +20°C i 30 min.
2. Fra hvert sentrifugerte Falcon-rør overføres interfaselaget (ca 8ml, cfr. fig. 3) til 10 nye Falcon-rør med 5ml NaCl 0,9% w/v. Fyll opp til 50ml med 0,9% w/v NaCl.
Sentrifugeres på 301 G, +4°C i 10 min.



3. Løs pellet fra Falcon-rørene i pkt. 2 i Elutrieringsbuffer. For å løse opp pellet i 4 nye glass. Fyll opp til 20ml med elutrieringsbuffer.
Sentrifugeres på 301 G, +4°C i 10 min.
4. Løs pellet i 5ml elutrieringsbuffer.
5. Celleantall telles i ADVIA celledetektor eller Bürker tellekammer (cfr. Kap. 5.3.).

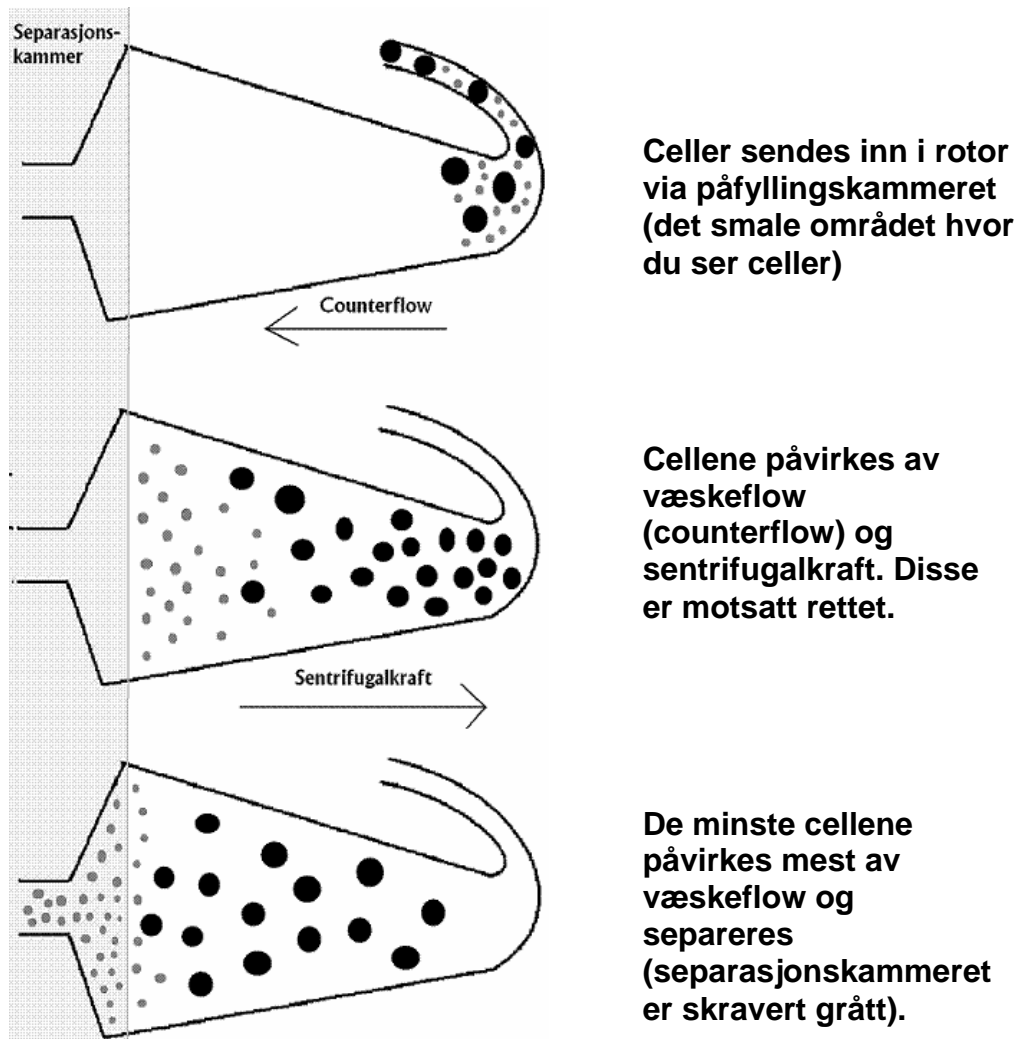
5.2.2. Elutriatorsentrifugering

Prinsippet bak en elutriator, er at sentrifugalkraft og væskeflow virker motsatt rettet. Store celler blir mest påvirket av sentrifugalkraften, mens små celler blir mest påvirket av væskeflow. Årsaken er at små celler har større overflate/masse-ratio enn store celler. Væskens kraft på cellen er proporsjonal med cellens overflate, mens sentrifugalkraften er proporsjonal med cellens masse.

En analogi man kan tenke seg er tunge regndråper som faller raskt mot bakken (tyngdekraften - sentrifugalkraften). Små dråper vil i større grad påvirkes av oppadrettet luftstrøm som følge av at bakken er varmere enn lufta (luftstrøm - væskeflow). Disse faller derfor ikke like fort og vi kjenner igjen fenomenet som tåke.

Elutriatorsentrifugering skjer ved at cellene som skal separeres (monocytt, lymfocytter = PBMC) injiseres i elutriatoren mens rotoren går. De minste cellene som sendes inn i elutriatoren flyter innover (mot venstre, cfr. Figur 7) med væskestrømmen, separeres og samles i et Falcon-rør.

Ved å justere rotorhastighet og flow-hastighet vil vi kunne justere hvilke celletyper vi ønsker å separere (cfr. Tabell 1).



Figur 7 Elutriatorsentrifugeringens prinsipp.

Tabell 1 Elutrieringstabell fra FOU-seksjonen, Klin. Kjem. Avd. UUS^{xiii}.

Fraksjon	Celletype	Sentrifugens rotorhastighet (rpm)	Pumpehastighet ml/min (flowrate)	Volum samlet opp i Falcon-rør (ml)
1	Erytrocytter Trombocyter	3500	30	200-250
2	Lymfocytter	3500	36,7	150
3	Lymfocytter Monocyter	4000	52,8	150
4	Monocyter Lymfocytter	4000	55	100
5	Monocyter	4000	70	150
5a	Monocyter	4000	65	100
5b	Monocyter Nøytrofile	4000	70	100
6	Nøytrofile	Stoppet	Max: 80-100	50

UTFØRELSE:

1. Celleløsningen, PBMC (cfr. Tetthetssentrifugering, kap. 5.2.1. pkt. 4), injiseres i påfyllingskammeret (Sample Reservoir).
2. Endring av rotorhastighet og pumpehastighet brukes for å separere ulike celletyper. Rotor- og væskestrømhastighet justeres etter et fast program (cfr. tabell 1). Fraksjonene samles kontinuerlig opp i Falcon-rør.
3. Fraksjonens monocytt-renhet kontrolleres med flowcytometri (cfr. kap. 5.2.3.). Fraksjoner med >90% monocyter fryses ned (cfr. 5.4. Nedfrysing av celler). Fraksjoner med <90% monocyter kastes.

5.2.3. Flowcytometri

Benyttes til å måle monocytt-renheten i de elutriorrensede fraksjonene.

Cellene som er merket med fluorescerende stoffer, blir arrangert enkeltvis i en laminær væskestrøm der de blir belyst med en stråle av eksitasjonslys. Dette lyset absorberes av det fluorescerende fargestoffet og får det til å sende ut lys (fluorescens). Disse lyssignalene registreres i en fotomultiplikator som omdanner lyssignalene til elektriske impulser.

Cellene måles enkeltvis med en hastighet på opptil flere tusen celler/sekund, og man oppnår relativt raskt et histogram som angir fordelingen av merket stoff pr. celle i en cellepopulasjon. Lagring og behandling av dataene utføres ved hjelp av en datamaskin tilkoblet flowcytometeret.

1. Cellene merkes med FITC-merket Annexin V og PI.
PI trenger inn i cellen ved membranskade (celledød) og bindes til DNA. Annexin V bindes til Phosphatidylere PS og indikerer apoptose.
2. De merkede cellefraksjonene sendes med en laminær væskestrøm forbi en lyskilde (laserstråle) i flowcytometeret.

3. Laserlysstrålen vil brytes og lyset spres både til siden (Side Scatter, SSC) og fremover (FSC) når det treffer cellen. Spredningssignalene registreres av fotomultiplikatorer. Spredningsmønsteret er karakteristisk for celletypen. Renheten bekreftes med CD14 farging.
4. Fluorescenssignalene (FITC-Annexin V) registreres av egen fotomultiplikator.
5. Alle sprednings- og fluorescenssignalene registreres kontinuerlig.
6. Ved å bearbeide signalene med spesielle software programmer kan resultatet fremstilles grafisk.

5.3. Celletelling

Alt.1: Bürker tellekammer: 10µl celledøsning + 90µl tellervæske for hvite. Tell antall monocytter i til sammen 3 A-ruter. Regn ut: Cellekonsentrasjon = (# telte monocytter/3) * 10⁴/ml.

Alt.2: ADVIA 60 hematologimaskin: 50µl celledøsning + 50µl 5% v/v FCS/RPMI. Vi får her en automatisk differensialtelling av cellefraksjonen. Vi må selv korrigere for fortynningen (dvs. multiplisere svaret med 2).

5.4. Nedfrysing av celler

1. Lag 50% v/v AT FCS/RPMI og sett på is. Mengde: X/2 ml.
2. Lag 20% v/v DMSO/RPMI og sett på is. Mengde: X/2 ml.
Vi bruker lik mengde av 50% (pkt. 1) og 20% (pkt. 2) i fortynningen av pelleten (cfr. pkt. 5 og 6). Cellene skal fryses med konsentrasjon 3-6 mill. PBMC/ml. Vi vet hvor mange celler vi har i Falcon-røret (cfr. ovenstående celletelling, kap. 5.3.). Mengden av pkt. 1 og 2 må derfor regnes ut på bakgrunn av celleantallet (#PBMC) i Falcon-røret:

$$\boxed{(\#PBMC)/(6 \cdot 10^6 \text{ PBMC/ml}) = X \text{ ml}} \quad X \text{ er total mengde 50\% og 20\%}.$$

3. Sentrifuger cellefraksjonen (cfr. Kap. 5.2.2. pkt. 3 og kap. 5.2.3.) på 201 G, 990 rpm, 20°C i 10 minutter.
4. Sug av og kast supernatanten.
5. Tilsett 50% v/v FCS/RPMI til pelleten og løs den opp med en plast pasteurpipette.
6. Tilsett dråpevis 20% v/v DMSO/RPMI med glass pasteurpipette over 3 minutt på is. Kontinuerlig blanding, langsomt i starten.
7. La blandingen stå på isvann i 10 minutt.
8. Fordel cellesuspensjonen på Nunc-rør 1ml pr. rør.

9. Sett rørene i romtemperert isoporboks med lokk i -80°C fryser i 2 timer, eller over natten. Overfør til -150°C fryser.

5.5. Opptining av monocytter

1. Lag 9ml 20% v/v FCS/RPMI (1,8 ml FCS + 7,2 ml RPMI) per Nunc-rør som skal tines.
2. Lag 20 ml 5% v/v FCS/RPMI tilsatt penicillin og streptomycin(P/S)(1 ml FCS + 0,4 ml P/S + 18,6 ml RPMI).
Sett løsning i romtemperatur.

Til 5.6. Monocytt-stimulering brukes også 5% v/v FCS/RPMI: For mengde, se kapittel 5.6., punkt 1.

3. Ta opp Nunc-røret med celleduspensjon (cfr. 5.4. pkt. 8) fra -150°C og sett i vannbad 37°C .
Sett umiddelbart i vannbad, 37°C .
Ta røret ut av vannbad når kun en liten ertstor isklump (4mm) er igjen.
4. Tørk utsiden på Nunc-røret med 70% v/v etanol og overfør innholdet til et Falcon-rør.
5. Tilsett 1ml 20% v/v FCS/RPMI dråpevis med pasteurpipette under stadig forsiktig blanding i 1ml celleduspensjon i løpet av 60 sekunder.
Tilsett 8ml 20% v/v FCS/RPMI dråpevis i løpet av 3 minutter.
6. Sentrifuger suspensjonen på 200 G, $+20^{\circ}\text{C}$ i 10 min.
7. Sug av supernatanten.
8. Løs opp pellet i 5% v/v FCS/RPMI, i alt 1ml. Bland med plast pasteurpipette.
9. Tell antall PBMC og regn ut monocytt-konsentrasjonen (cfr. 5.3. celletelling).
10. Celleløsningen holdes deretter på isvann.

5.6. Monocytt-stimulering: test av celler til PCA og TNF- α

12.500 celler/brønn

300pg LPS/brønn

Inkuberes i 4 timer i 37°C med 5% CO_2

1. Lag 10 ml 5% v/v FCS/RPMI tilsatt P/S (9,5ml RPMI + 0,5ml FCS + 200 μl P/S).
Skal brukes i pkt. 4 og 6.
2. Lag 2 ml LPS-løsning. Fortynn til 2500pg/ml (300pg/brønn).
3. Tin cellene på vanlig måte (cfr. kap. 5.5.).
Cellene er da sentrifugert på 200 G, 10 min, 20°C (cfr. kap. 5.5. pkt. 6), cellepellet er løst i 1ml 5% v/v FCS/RPMI (cfr. kap. 5.5. pkt. 7-8) og celletelling utført (cfr. kap. 5.5. pkt. 9).
4. Lag celleduspensjon med kjent monocyttkonsentrasjon. Etter telling lages en celleduspensjon (celler og 5% v/v FCS/RPMI) på 156.250 celler/ml. Dette gir 12.500

celler/80µl (celler/brønn). Lag 1000µl. Den mer ærgjerrige kan våge seg utpå følgende regnestykke:

- a: kjent cellekonsentrasjon, pkt. 6.
- x: andelsvis mengde av celleløsning/ml (cfr. kap. 5.5., pkt 10).
- 1-x: andelsvis mengde av 5% v/v FCS/RPMI/ml.

- (1) $a * x = 156.250$ celler/ml. x er ukjent.
- (2) $X = x * 80 \mu\text{l/brønn} = \text{andel celleløsning i hver brønn.}$
- (3) $X * \# \text{ brønner} = \text{total mengde celleløsning.}$
- (4) $(1 - X) * \# \text{ brønner} = \text{total mengde 5\% v/v FCS/RPMI.}$

- 5. Bland sammen (3) og (4) i et Falcon-rør.
- 6. Så ut i 4 brønner på 2 plater til utsåing av celler. 80 µl cellesuspensjon (pkt. 5) i hver brønn.
To av brønnene tilsettes 120µl 5% v/v FCS/RPMI og to av brønnene 120µl LPS-løsning.
Sett platene 4 timer i inkubator på 37°C med 5% CO₂.
Cellene såes ut i to plater slik at man har en reserve hvis PCA-analysen ikke fungerer.
- 7. Sentrifuger platene på 47 G, 15°C i 7 min.
- 8. Overfør ca 180µl av supernatantene til eppendorfrør. Frys disse i -80°C fryser.
Merk supernatant fra de ustimulerte brønnene med minustegn, de stimulerte med plusstegn.
Disse brukes til analyse av TNF-α.
- 9. Sug resten av supernatantene i brønnene forsiktig av. Tilsett brønnene så 75µl NaCl/Owrens buffer.
Lokkene tapes på og platene fryses i -80°C frem til analysering.
Disse platene kan senere brukes til analysering av prokoagulant aktivitet (PCA).

5.7. Opptining av supernatant med TNF-α.

- 1. Tin opp eppendorfrørene med supernatant (cfr. kap. 5.7. pkt. 9) i vannbad på 37°C.
- 2. Miks rørene på whirl-mikser.
- 3. Fortynn supernatantene med Standard 0 fra EASIA kitet på følgende måte:
 - a) Supernatant fra ustimulerte monocytt 1:4 (cfr. kap. 5.6. pkt. 7).
 - b) Supernatant fra stimulerte monocytt 1:4 (cfr. kap. 5.6. pkt. 7).Disse omtales fra nå av "Prøver".

5.8. TNF- α EASIA

Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay (EASIA) utført på mikrotiterplater. Essayet er basert på et oligoklonalt system hvor en blanding av monoklonale antistoffer rettet mot bestemte epitoper av TNF- α brukes.

Reagensene som brukes i 5.8. og 5.7. pkt. 3 hører med TNF- α EASIA (cfr. kap. 4.2.).

1. Pipetter 50 μ l inkubasjonsbuffer i hver av brønnene du skal bruke.
2. Pipetter så 200 μ l av 5 Standarder, 2 Kontroller, 1 Standard 0 og Prøver (cfr. kap. 5.7. pkt. 3).
Standardene og Kontrollene følger med ELISA kitet. Disse har oppgitt konsentrasjon fra produsenten, hvor Kontrollene også er oppgitt med 95% konfidensintervall. Standard 0 følger også med kitet, og betegnes også 0-plasma.
3. Inkubør i 2 timer ved romtemperatur på shaker (700 rpm).
TNF- α reagerer med antistoff(Mabs1) bundet til veggen på mikrotiterbrønnen.
4. Bland ut Biosource Wash Solution med destillert vann i forholdet vann/BWS: 200/1.

Mengden = 0,4 ml/brønn * 3 skyllinger/vask * 2 vask (pkt 5 og 9) * #brønner = 2,4 ml * #brønner.

5. Aspirer supernatanten.
Aspirer og vask tre ganger ved hjelp av BioSource Wash Solution.
Ikke fastbundet antigen vaskes da bort.

6. Anti-TNF- α -konjugat løses i konjugatbuffer i forholdet 1:10.

Antall brønner	Konsentrert konjugat	Konjugat buffer	Arbeidsvolum
8	50 μ l	500 μ l	550 μ l
16	100 μ l	1000 μ l	1100 μ l
24	150 μ l	1500 μ l	1650 μ l
32	200 μ l	2000 μ l	2200 μ l
48	300 μ l	3000 μ l	3300 μ l
96	600 μ l	6000 μ l	6600 μ l

7. Pipetter 100 μ l Standard 0 og 50 μ l anti-TNF- α -konjugat i hver brønn.
Anti-TNF- α -konjugat er et peroxidasemerket antistoff (Mab2). Dette binder seg til TNF- α : Mabs1 - TNF- α - Mab2 – peroxidase.
8. Inkubør i 2 timer ved romtemperatur på shaker (700 rpm).
9. Aspirer supernatanten fra hver brønn.
Vask og aspirer tre ganger ved hjelp av Biosource Wash Solution.
Dersom de opprinnelige løsningene inneholdt TNF- α , vil vi få Mabs1 - TNF- α - Mab2 – peroxidase-kompleks bundet fast til veggen på brønnene. Fritt antistoff-peroksidase (Mab2) vil bli skylt vekk under vaskingen.

10. Lag Chromogenic Solution av Substrate-buffer og Chromogen TMB. Forhold: 105:1.
Mengde: 200µl * #brønner.
11. Tilsett hver brønn 200µl Chromogenic Solution. La reaksjonen gå på shaker i 30 minutt.
Når TMB og H₂O₂ tilsettes brønnene, vil peroksidering av H₂O₂ indukert av HRP bundet på antistoff (Mab2), føre til oksidering av TMB. Det oksiderte produktet av TMB ved sur pH er veldig stabilt. TMB er fargeløst, mens oksidert TMB gir løsningen farge^{xv}. Løsningens farge sier oss noe om hvor stor peroksidaseaktiviteten har vært og indirekte hvor mye HRP vi har bundet til veggen på brønnen.
12. Stopp reaksjonen ved å tilsette 50 µl H₂SO₄ i hver brønn.
 $H_2SO_4 + H_2O_2 \rightarrow SO_4^{--} + 2H_2O$.
Tilsetting av H₂SO₄ fører til at H₂O₂ i brønnene blir brukt opp. Dermed avsluttes oksideringen av TMB.
13. Mikrotiterplaten blir så avlest på passende bølgelengde(450nm og 490nm). Data samles på PC og bearbeides med tilpasset software program. Ved hjelp av dette blir en standardkurve etablert på bakgrunn av de fem Standardprøvene:

Y = absorbanse i løsningen i brønnen.

X = TNF-α-konsentrasjon.

X = konsentrasjon er oppgitt fra produsent. Y = absorbanse måles av absorbansemåleren.

Dermed får vi 5 (X,Y)-koordinater som plottes inn i et diagram. Software program

beregner så en lineær standardkurve på bakgrunn av disse fem koordinatene: $Y = aX + b$.

Denne standardkurven ligger til grunn for utregningene av de ukjente prøvene:

Mengden av substrat blir bestemt ved å måle absorbanse til den aktuelle løsningen.

Y = absorbanse plottes inn i standardkurven.

Software programmet regner så ut X = TNF-α- konsentrasjonen i prøven: $X = Y/a - b/a$.

Det er de ukjente prøvenes utregnede TNF-α-konsentrasjon som benyttes i utregningene i kap. 6)Resultater og 7)Diskusjon.

Standardkurven kontrolleres av de to Kontrollene:

De to Kontrollene har oppgitt TNF-α-konsentrasjon med 95% konfidensintervall. Dersom våre målte TNF-α-konsentrasjoner av Kontrollene faller innenfor disse intervallene, godkjennes Standardkurvene.

Resultater og Diskusjon

Resultater og Diskusjon innehar begge følgende punkter

X.1. Våre TNF- α målinger

- X.1.1. Stimulerte(+) vs. Ustimulerte(-) monocytter.
- X.1.2. In vitro LPS-stimulert fullblod.
- X.1.3. Donorvariasjon.
- X.1.4. Hvor gode er målingene våre? Spredning på materialet.
- X.1.5. Våre resultater vs. FOU-seksjonens resultater.
- X.1.6. Øyvinds resultater vs. Marius' resultater.

X.2. Kalibrering av leser. Etablering og sikring av standardkurven.

- X.2.1. 0-prøven.
- X.2.2. Standardene.
- X.2.3. Kontrollene.

6) Resultater

6.1. Våre TNF- α målinger

Våre forsøk ble utført i tidsrommet 17.01.05 til 01.06.05.

I alt gjennomførte vi 5 forskjellige forsøk (Tabell 2).

- I forsøkene 1, 3 og 4 målte vi TNF- α i supernatanter fra isolerte monocytter, som enten var eller ikke var stimulert med LPS. Supernatantene var fra monocytt-stimuleringer gjort av FOU-seksjonen.
- I forsøk 5 stimulerte vi selv isolerte monocytter og målte TNF- α i supernatanten.
- I forsøk 2 målte vi TNF- α i heparinplasma fra in vitro LPS-stimulert fullblod.

Alle forsøkene ble utført av både Øyvind og Marius (Totalt antall forsøk: $2 * 5 = 10$).

FOU-seksjonen nummererer sine elutriatorløsninger fortløpende (cfr. Produksjonsdiagram).

Disse betegnes EL (Elutriation Batch) <nr> (cfr. Figur 8, Figur 11 og **Error! Reference source not found.**

Tabell 2

Oversikt over våre TNF- α målinger (cfr. kap 9, Appendix)

Forsøk (dato)	Isolerte monocytter				Fullblod LPS-stimulert		Totalt antall brønner
	Ustimulerte		LPS- stimulerte				
	Prøver	Paralleller	Prøver	Paralleller	Prøver	Paralleller	
Forsøk 1 (17.01.05)	1	1	5	3			16
Forsøk 2 (26.01.05)					4	6	24
Forsøk 3 (12.05.05)	3	1	3	1			6
Forsøk 4 (25.05.05)	7	1	7	3			28
Forsøk 5	1	2	1	4			16

(01.06.05)							
------------	--	--	--	--	--	--	--

6.1.1. Stimulerte(+) vs. Ustimulerte(-) monocytytter.

Vi regnet ut et gjennomsnitt av TNF- α -konsentrasjonene i supernatantene fra henholdsvis LPS-stimulerte og ustimulerte monocytytter.

Verdiene i Tabell 3 er regnet ut på bakgrunn av prøvenes målte absorbanser plottet inn i prøvens tilhørende standardkurve. Dette gir oss en utregnet TNF- α -konsentrasjon for hver av prøvene.

I avlesningen av de ustimulerte prøvene hadde disse brønnene lavere absorbanse enn standardkurvens verdi i skjæringspunktet med Y-aksen. Dette forklarer at disse får TNF- α -konsentrasjoner <0 .

Tabell 3

Gjennomsnittlig TNF- α konsentrasjon (pg/ml) i supernatant fra LPS-stimulerte og ikke LPS-stimulerte monocytytter. Fra forsøkene 1, 4, 5.

	Ustimulerte monocytytter (n = 10)	LPS-stimulerte monocytytter (n = 40)
Marius	-45	1161
Øyvind	-39	1324

6.1.2. In vitro LPS-stimulert fullblod.

TNF- α -konsentrasjon i heparinplasma fra LPS-stimulerte monocytytter i fullblod var markert høyere enn i supernatantene fra LPS-stimulerte isolerte monocytytter.

Vi fant 6-7 ganger høyere konsentrasjon i Forsøk 2 enn i de andre forsøkene (cfr. Tabell 4).

Tabell 4

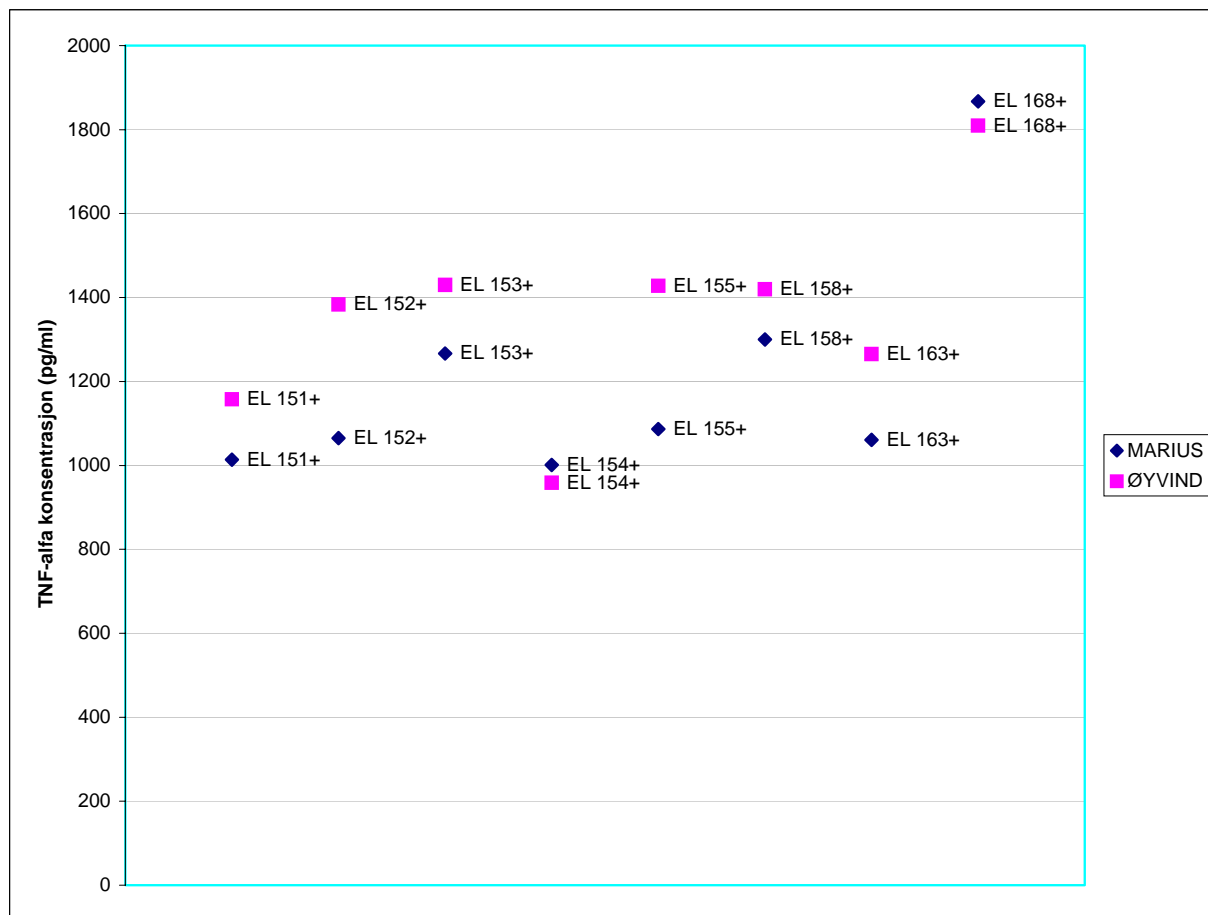
Gjennomsnittlig TNF- α konsentrasjon (pg/ml) i supernatant fra monocytytter stimulert med LPS *in vitro* og heparinplasma fra fullblod stimulert med LPS *in vitro*. Fra forsøkene 1, 2, 4, 5.

	Monocytytter stimulert <i>in vitro</i> (forsøk 1,4,5) (n = 40)	<i>In vitro</i> LPS-stimulert fullblod. (forsøk 2) (n = 24)
Marius	1161	7573
Øyvind	1324	8536

6.1.3. Donorvariasjon.

Vi var interessert i å se om det var donorvariasjon med hensyn til TNF- α produksjon som respons på samme LPS-stimulering.

Høyeste TNF- α -konsentrasjon ble funnet for EL 168, som lå over 1800 pg/ml (Forsøk 5). Laveste verdi fant vi for EL 154 som lå rundt 1000 pg/ml.



Figur 8 TNF- α produksjon i monocytter fra 8 ulike donores som respons på samme LPS-stimulering. Fra forsøk 1, 4 og 5.

6.1.4. Hvor gode er målingene våre? Spredning på materialet.

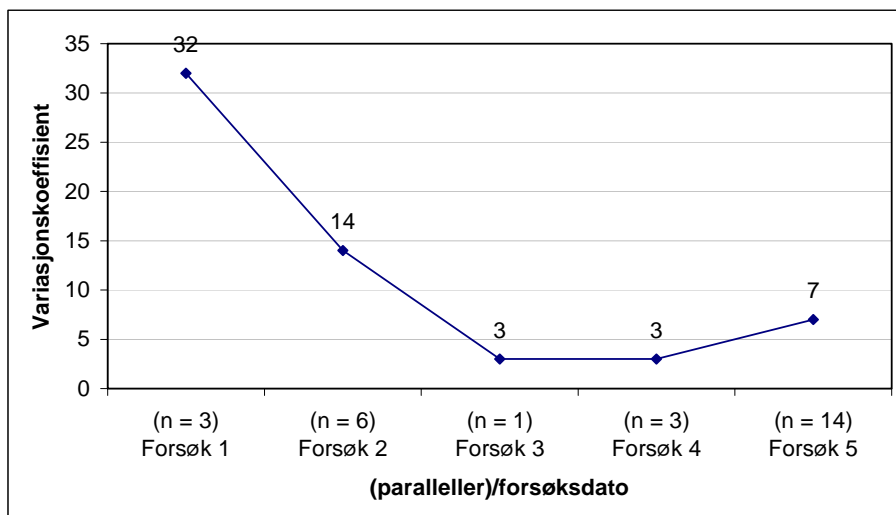
For å danne oss et inntrykk av hvor godt vi arbeidet, regnet vi etter hvert forsøk ut gjennomsnitt, standardavvik og variasjonskoeffisient for TNF- α -konsentrasjonen i brønnene med samme prøve (på bakgrunn av prøvens paralleller).

Det var tydelig forskjell mellom oss i de to første forsøkene (Fig. 9 og 10). Med en del øvelse oppnådde vi begge variasjonskoeffisienter under 7-8%.

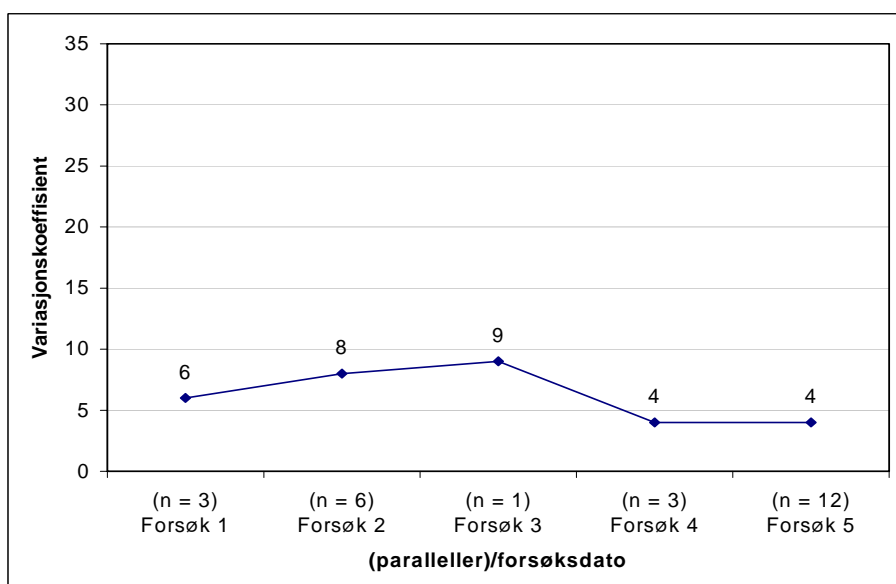
*Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient.

Vi regnet ut et samlet gjennomsnitt av de variasjonskoeffisientene vi fikk for de ulike prøvene som var i samme forsøk. Denne verdien benevnes gjennomsnittlig variasjonskoeffisient i Fig. 9 og 10.

Eksempel: I Forsøk 1 hadde vi 5 Prøver (EL BATCH), hver med 3 paralleller. Vi regnet ut variasjonskoeffisient for de 5 på bakgrunn av de 3 parallellene. Deretter summerte vi de 5 variasjonskoeffisientene og delte på 5.



Figur 9 Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient* for Marius sine 5 TNF- α -forsøk.



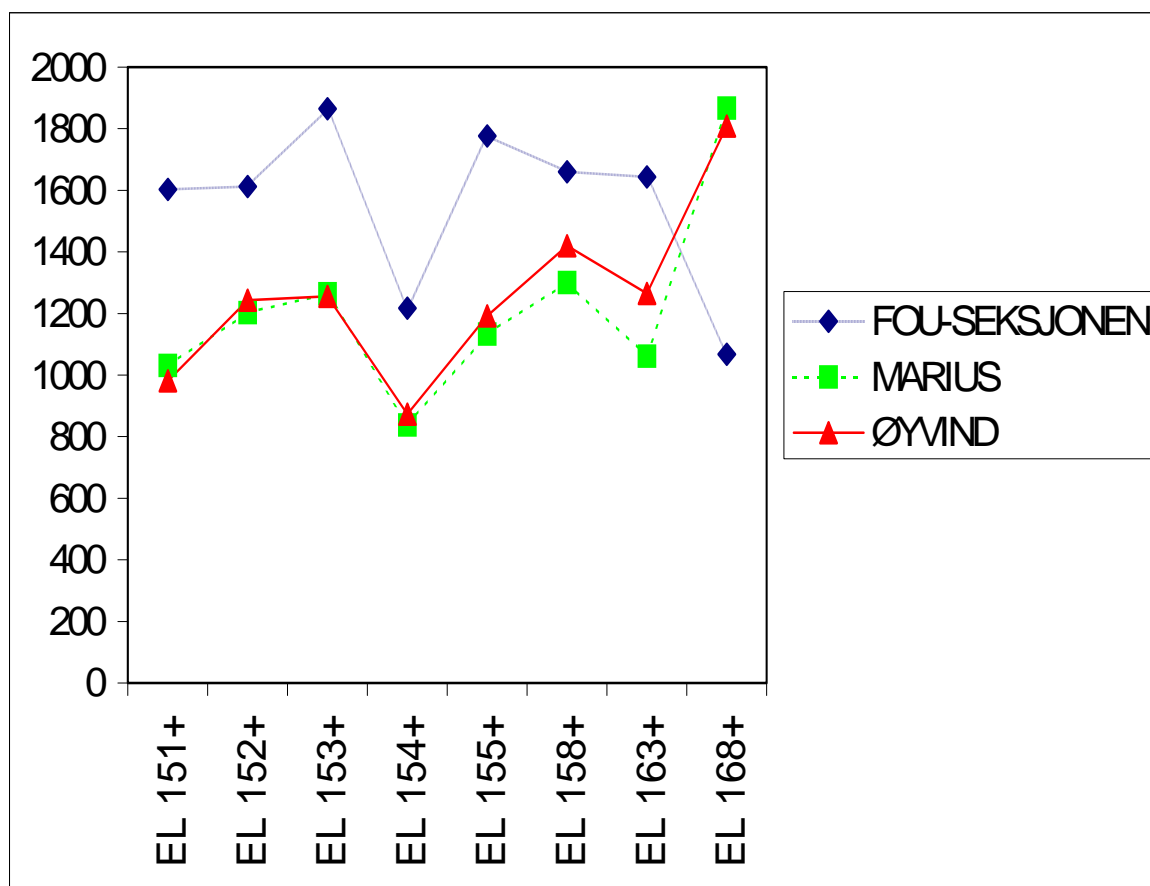
Figur 10 Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient* for Øyvind sine 5 TNF- α -forsøk.

6.1.5. Våre resultater vs. FOU-seksjonens resultater

Vi var interessert i å se hvordan våre TNF- α målinger harmonerte med FOU-seksjonens resultater. Figur 4 viser våre og FOU-seksjonens TNF- α -konsentrasjon i supernatant fra LPS-stimulerte monocyttter. Samme mengde LPS er brukt i alle forsøk.

Våre verdier synes å ligge systematisk lavere enn FOU-seksjonens verdier for EL 151-163. Disse svarer til Forsøk 4.

Vi ligger over FOU-seksjonens resultat for EL-168. Denne svarer til Forsøk 5.



Figur 11 TNF- α konsentrasjon (pg/ml) i supernatantene fra LPS-stimulerte monocyttter i forsøk 4 og 5.

6.1.6. Øyvinds resultater vs. Marius' resultater.

Vi så at våre målinger følger samme mønster (Figur 11).

Derfor var vi interessert i å se om våre forsøk kunne sammenlignes innbyrdes.

Ved hjelp av dobbel t-test og utregning av 95% KI for differansen mellom våre forsøk, hadde vi to verktøy som kunne si oss noe om dette.

Tabell 5

Sammenligning av resultatene fra Forsøk 5, EL 168. 95% konfidensintervall og t-verdi med 11 frihetsgrader.

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Øyvind - Marius	-4,52283	18,70269	5,39900	-16,40595	7,36029	-0,838	11	,420

95% konfidensintervall

Tabell 5 viser et 95% KI for differansen mellom Øyvind og Marius på (-16,4 , 7,4). Ettersom 0 inngår i 95% KI, vil vi ikke kunne si at det er signifikant forskjell mellom Marius sine og Øyvind sine resultater i Forsøk 5.

Dobbel T-test

H_0 : Marius = Øyvind.

H_1 : Marius \neq Øyvind.

KI 95%.

Dobbel t-test gir oss $t = -0,838$ med 11 frihetsgrader. Ut fra tabell finner vi at dette gir oss verdi $>0,25$.

Ettersom verdien $0,25 > 0,05$, faller vi utenfor KI 95%.

Dette vil si at vi må forkaste H_1 -hypotesen og stå ved H_0 .

Konklusjon: våre resultater kan sammenlignes.

6.2. Kalibrering av leser. Etablering og sikring av standardkurven.

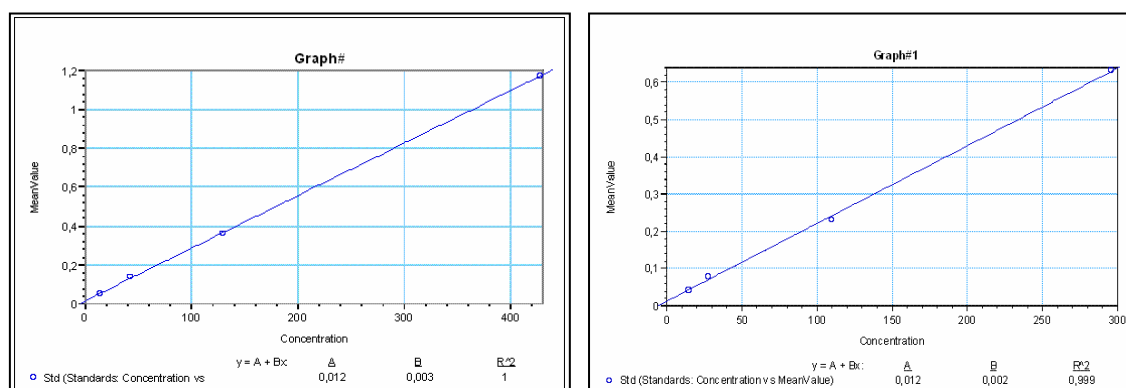
6.2.1. 0-prøven.

Alle 0-prøver i alle 5 forsøk viste verdien 0.

6.2.2. Standardene.

- Alle standardkurvene fra de to forsøkene 1 og 2 fikk stigning 0,003 på grafen.
- Alle standardkurvene fra de tre forsøkene 3, 4 og 5 hadde stigningstall 0,002.

Vi fikk varierende skjæringspunkt på y-aksen (verdi A) i alle våre 5 forsøk
Max: 0,04. Min: -0,037. Mean: 0,013



Figur 12 Eksempler på standardkurver. Ringene står for de målte verdiene. Grafen representerer den etablerte standardkurven. Std.kurve til venstre fra Forsøk 1 (Øyvind), høyre fra Forsøk 4 (Øyvind).

I løpet av perioden hvor vi utførte våre 5 forsøk, skiftet leverandøren konsentrasjon på standardene. De kjente konsentrasjonene på standardene er gjengitt i Tabell 6.

Tabell 6

De ulike standardenes kjente TNF- α -konsentrasjon (pg/ml).

<u>Standard</u>	<u>Forsøk 1 og 2</u>	<u>Forsøk 3, 4 og 5</u>
Std. 1	14,900	14,700
Std. 2	43,000	27,500
Std. 3	130,000	110,000
Std. 4	428,000	296,000
Std. 5	1385,000	1082,000

6.2.3. Kontrollene.

Vi hadde to kontrollprøver med oppgitt 95% konfidensintervall.

Kontroll 1: 67 ± 17 pg/ml

Kontroll 2: 374 ± 112 pg/ml

18 av 20 målinger av de to kontrollene falt innenfor 95% KI av kontrollenes oppgitte verdier. De to som falt utenfor, var begge av typen Kontroll 1.

7)

Diskusjon

7.1. Våre TNF- α målinger

7.1.1. Stimulerte(+) vs. Ustimulerte(-) monocyttar.

Vi har vist at monocyttar, under inkubasjon i 37°C ved 4 timer, lar seg stimulere av LPS til TNF- α -produksjon.

Vi kunne ikke finne tilsvarende TNF- α -produksjon når monocytterne kun ble inkubert som nevnt over, men ikke tilsatt LPS. Resultatene vi fikk tydet på at disse ustimulerte monocytterne ikke produserte TNF- α .

Dette samsvarer med det faktum at monocyttar kan brukast som bioindikator på om et reagens er forurenset med LPS.

Siden vi brukte en fast LPS-konsentrasjon til bestemt antall monocyttar i hver brønn, kan vi ikke si noe om monocytters egenskap som bioindikator, hva angår sensitivitet. Vi kunne ha nærmet oss dette ved å fortynne LPS-løsningen trinnvis og undersøkt når TNF- α -konsentrasjonen ikke lenger var signifikant forskjellig fra 0.

7.1.2. *In vitro* LPS-stimulert fullblod.

Vi målte TNF- α i heparinplasma fra *in vitro* LPS-stimulert fullblod fra 4 donores (Forsøk 2). Alle disse 4 prøvene viste høyere TNF- α -konsentrasjon for LPS-stimulert fullblod enn prøvene med isolerte monocyttar som ble stimulert med LPS (Tabell 4).

Dette viser at monocytterne produserer mer TNF- α når de LPS-stimuleres i fullblod (Forsøk 2) enn når de isoleres fra fullblod og deretter stimuleres med LPS (forsøk 1, 3, 4 og 5).

Aktuelle forklaringsmodellar er:

- Monocytterne i fullblod (Forsøk 2) ble stimulert med større mengde LPS enn de isolerte monocytterne (forsøk 1, 3, 4 og 5). Vi fikk nemlig ikke oppgitt hvilken LPS-konsentrasjon fullblod ble stimulert med. Vi anser denne siste forklaringen for å være den mest betydningsfulle.
- Monocyttiliseringen svekker monocytters evne til å bli stimulert^{xiv}.
- Det finnes faktorer i fullblod som potenserer monocyttaktiveringen. Faktorer vi først og fremst tenker på er lymfocytter^{xvi} og MD-2.

7.1.3. Donorvariasjoner.

Våre forsøk viste at LPS-stimulert TNF- α -produksjon varierte betydelig fra EL BATCH til EL BATCH (Figur 8, kap. 6.1.3.). Variasjonene i TNF- α -produksjon kan skyldes metodens analytiske variasjon eller biologiske variasjoner. Vi undersøkte ikke, og kjenner ikke metodens analytiske variasjon og kan da egentlig ikke uttale oss om våre forsøk kunne avdekke såkalte "high-" og "low-responders"^{xvii}.

Dersom vi kjente metodens analytiske variasjon ved at vi hadde med langsgående kontroller - ville vi kunne vurdere om prøvene våre inneholdt "high-" og "low-responders".

7.1.4. Hvor gode er målingene våre? Spredning på materialet.

For å undersøke hvor gode målingene våre var, regnet vi ut variasjonskoeffisient(VC). VC er standardavvik/gjennomsnitt. Dermed kan vi sammenligne VC fra ulike data, uavhengig av om disse har ulikt gjennomsnitt.

Vi ser et fall i VC ettersom forsøkene skrider frem.
Dette tyder på at vi er blitt bedre til å utføre forsøket¹.

7.1.5. Våre resultater vs. FOU-seksjonens resultater.

Vi fikk kun oppgitt et gjennomsnitt av FOU-seksjonens resultater. Vi hadde ikke tilgang på de enkelte målingene, og kunne derfor ikke regne ut standardavvik av disse.

Derfor valgte vi å plote våre og FOU-seksjonens resultater i et diagram. Dette viste en tydelig korrelasjon mellom våre og FOU-seksjonens TNF- α -konsentrasjoner, ettersom kurvene hadde tilnærmet lik form (Fig. 8).

Vi ser en tendens til at FOU-seksjonens konsentrasjoner ligger høyere enn våre. Dette kan henge sammen med at TNF- α brytes ned i løpet av lagringstiden, da FOU-seksjonen brukte fersk supernatant mens vi brukte nedfrosset, lagret supernatant. Det er også kjent at frysing og tinging kan endre proteinets struktur og dermed påvirke den immunolytiske målemetoden (vi brukte ELISA).

Forsøk 5 (EL168+): Her ligger våre konsentrasjoner høyere enn FOU-seksjonens. I dette forsøket har vi tint, sådd ut og stimulert monocytterne selv, og våre høyere TNF- α -konsentrasjoner kan henge sammen med at våre monocytter ble kraftigere stimulert enn da FOU-seksjonen stimulerte dem (høyere LPS-konsentrasjon). En annen mulig forklaring kan være at vi sådde ut flere monocytter enn FOU-seksjonen. En tredje forklaring kan være at monocytterne i EL BATCH 168 hadde en høyere TNF- α -produksjon på samme LPS-stimulering ("high-responder").

¹ Angående forsøk 5: her har vi holdt brønnene separat helt fra dyrking (boks 6 i Flowchart) frem til ELISA. Dette til forskjell fra de 4 første, hvor supernatant fra ulike brønner med monocytter ble blandet og deretter målt for TNF- α -konsentrasjon.

Forsøk 5 bærer derfor med seg feilkilder fra monocytt-stimulering. Det gjør ikke de 4 første forsøkene (1, 2, 3, 4).

7.1.6. Øyvinds resultater vs. Marius' resultater.

Figur 11 (cfr. kap. 6.1.6.) viser kurve over målt konsentrasjon $\text{TNF-}\alpha$ i de ulike prøvene i forsøk 4 og 5 for både FOU-seksjonen, Marius og Øyvind. Marius og Øyvind sine kurver er tilnærmet like. Dette gjorde at vi ønsket å undersøke hvorvidt våre resultater kunne sammenlignes innbyrdes. Vi valgte å se om det var signifikant forskjell mellom resultatene våre i Forsøk 5. Vi fant ingen signifikant forskjell, da 95% konfidensintervall for differansen mellom våre gjennomsnitt omfattet verdien 0.

Ettersom materialet i Forsøk 5 kun består av 14(Marius) og 12(Øyvind) konsentrasjoner, behøvde vi å utføre en dobbel t-test ettersom materialet er for lite til å bruke en standard normalfordelingskurve. Dobbelt T-test viste at vi kunne sammenligne våre tall innbyrdes.

7.2. Kalibrering av leser. Etablering og sikring av standardkurven.

7.2.1. 0-prøven.

Til denne brukes Standard 0 fra ELISA kitet. Den brukes til å kalibrere maskinen. Denne får alltid verdien 0.

7.2.2. Standardene.

Standardkurven ble etablert på bakgrunn av 5 standarder med kjent konsentrasjon TNF- α . Den høyeste standarden ble maskert for å få en kurve som svarte best mulig til de målte, kjente standardverdiene*.

Hvorfor lineær standardkurve?

Mengden TNF- α er proporsjonal med absorbansen i løsningen. Bakgrunnen er at:

1. Mengden TNF- α er proporsjonal med dannelsen av peroksidasekompleks (Mab1-TNF- α -Mab2-HRP).
2. Mengden peroksidasekompleks er videre proporsjonal med oksidering av tetramethylbenzidine (TMB) til imine. Imine absorberer $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$. Dette utnyttes til å måle imines konsentrasjon fotospektrometrisk.

*En god standardkurve har:

1. Liten avstand mellom standardpunktene og standardkurven.
2. Videre er det ønskelig at kurven skjærer gjennom origo.

7.2.3. Kontrollene.

Kontrollenes funksjon er å kvalitetssikre den etablerte standardkurven. Dersom målt TNF- α -konsentrasjon i Kontrollene ligger innenfor 95% KI for Kontrollenes oppgitte verdi, godkjenner vi standardkurven.

Kontrollene målt mot standardkurven, viste at standardkurven var best i det øvre området. Som konsekvens av dette, valgte vi å fortynne våre ukjente stimulerte Prøver med Standard 0 slik at de var forventet å ligge i det øvre området av standardkurven (kons. 2-300pg/ml).

8)

Ettertanke

Når vi ser tilbake på de personlige målene vi satte oss i kap. 2) Målet med oppgaven, vil vi si følgende:

8.1. Få innblikk i planlegging og praktisk utføring av eksperimentell forskning

Store deler av oppgaven vår har gått med til å utføre de 5 forsøkene. Vi føler dermed at vi har fått et godt innblikk i hva som trengs av planlegging i forbindelse med eksperimentell forskning. Dette viser vi i vårt Prosedyrediagram i kap. 2) Målet med oppgaven. Den praktiske gjennomføringen av eksperimentene, ble vi stadig bedre på (cfr. Kap. 5) *Metode* og kap. 7) *Resultater*).

8.2. Se moderne forskningsverktøy i bruk.

Vi har fått innføring i blant annet elutriator, flowcytometer, ADVIA60 celleteller og ELISA kit.

Vi har fått en forståelse av hva disse kan brukes til. Dette viser vi i beskrivelsene i 5) *Metoder*.

8.3. Bearbeide våre måleresultater med enkle statistiske metoder

Ved hjelp av dataprogrammet SPSS har vi regnet ut våre resultaters gjennomsnitt, standardavvik og variasjonskoeffisient. Dette har gitt oss en pekepinn på hvorvidt vi har blitt bedre til å utføre ELISA (cfr. Kap. 7.1.4.), hvor nær vi er FOU-seksjonens målinger på de samme prøvene(cfr. Kap. 7.1.5.), og individuelle variasjoner mellom Marius og Øyvind (cfr. Kap 7.1.6).

8.4. Bedre vår generelle forståelse av sepsis og immunologi ved lesing av litteratur på feltet

Her benyttet vi artikler funnet på PubMed, sentrale bøker om emnene, samt doktorgradsavhandlingen til Anne-Sophie Wiborg Møller (Universitetet i Oslo, 2005). Vi satte oss spesielt inn i sepsis og aterosklerose, da disse emnene er av de mest studerte i FOU-seksjonen, Klin. Kjem. Avd., UUS.

8.5. Trene på en logisk og systematisk fremstilling av et felt.

Med mye og god hjelp av Peter Kierulf og Gun Britt Joø føler vi nå at vi har fått en god oversikt over hva de ulike delene i en artikkel bør inneholde (abstract, innledning, materialer og metoder, resultater, diskusjon, konklusjon). Dette har vi benyttet og hatt god bruk for i arbeidet med prosjektoppgaven vår.

Oppsummering:

Øvelse gjør mester!

Vi nådde våre målsettinger.

Viktighet av selvstendig oppgave.

Flott miljø. Kjempegod veiledning.

Pipettering er gøy! Men ikke lett å holde alt sterilt til enhver tid!

Til våre veiledere Gun Britt og Peter Kierulf: tusen takk for kjempegod veiledning! Vi har virkelig satt pris på deres hjelp! Ring neste gang FOU-gruppen har lønningspils: FOG-gruppen stiller mannsterke!

9) Appendix

Marius Osaland Muis - standardkurve

Forsøksnummer Dato (standarder brukt i utregningen)	Prøver hvor denne standardkurven er brukt i utregningen.	Standardkurvens ligning
Forsøk 1 17.01.05 (4 laveste standarder)	EL 151+ EL 151- EL 152+ EL 153+ EL 154+ EL 155+	$Y = 0,003x - 0,037$
Forsøk 2 26.01.05 (4 laveste standarder)	Pasient 1 Pasient 2 Pasient 3 Pasient 4	$Y = 0,003x + 0,012$
Forsøk 3 12.05.05 (4 laveste standarder)	EL 158+ EL 158- EL 161+ EL 161- EL 162+ EL 162-	$Y = 0,002x + 0,035$
Forsøk 4 25.05.05 (4 laveste standarder)	EL 151+/- EL 152+/- EL 153+/- EL 154+/- EL 155+/- EL 158+/- EL 163+/-	$Y = 0,002x + 0,012$
Forsøk 5 01.06.05 (4 laveste standarder)	EL 168- EL 168+	$0,002x + 0,029$

Øyvind Steinsbø - standarkurve

Forsøksnummer Dato (standarder brukt i utregningen)	Prøver hvor denne standarkurven er brukt i utregningen.	Standardkurvens ligning
Forsøk 1 17.01.05 (4 laveste standarder)	EL 151+ EL 151- EL 152+ EL 153+ EL 154+ EL 155+	$Y = 0,002x - 0,007$
Forsøk 2 26.01.05 (4 laveste standarder)	Pasient 1 Pasient 2 Pasient 3 Pasient 4	$Y = 0,003x + 0,003$
Forsøk 3 12.05.05 (4 laveste standarder)	EL 158+ EL 158- EL 161+ EL 161- EL 162+ EL 162-	$Y = 0,002x + 0,04$
Forsøk 4 25.05.05 (4 laveste standarder)	EL 151+/- EL 152+/- EL 153+/- EL 154+/- EL 155+/- EL 158+/- EL 163+/-	$Y = 0,002x + 0,021$
Forsøk 5 01.06.05 (4 laveste standarder)	EL 168- EL 168+	$0,002x + 0,019$

Marius Osaland Muis – resultater

<u>Forsøk</u>	<u>Prøve</u>	<u>Absorbanse</u>	<u>TNF-α- konsentrasjon</u>	<u>Glennomsnitt</u>	<u>Standardavvik</u>	<u>Variasjonskoeffisi- ent</u>	<u>Uttynning</u>	<u>Adj.Result (Glennomsnitt x Uttynning)</u>
FORSØK 1 17. JANUAR 2005	151+	0,167	75,115	99,567	27,403	27,5	10	995,673
		0,314	129,185					
		0,219	94,402					
	151-	-0,189	-55,736	-55,736	0	0	4	-222,944
	152+	0,168	75,446	92,684	18,646	20,1	10	926,843
		0,269	112,474					
		0,208	90,132					
	153+	0,348	141,626	127,001	32,021	25,2	10	1270,012
		0,208	90,28					
		0,368	149,098					
	154+	0,403	161,981	116,437	71,984	61,8	10	1164,374
		0,054	33,449					
		0,381	153,883					
	155+	0,324	132,976	104,07	25,088	24,1	10	1040,701
		0,211	91,273					
		0,202	87,961					
FORSØK 2 26. JANUAR 2005	Pasient 1	0,043	11,233	12,14	4,566	37,6	500	6069,953
		0,048	13,195					
		0,046	12,492					
		0,031	6,974					
		0,067	20,157					
		0,036	8,788					
		0,221	77,373	79,225	8,239	10,4	100	7922,457
	Pasient 2	0,225	78,521					
		0,225	78,558					
		0,191	66,152					
		0,259	91,334					
		0,238	83,409					
	Pasient 3	0,214	74,595	77,484	2,359	3	100	7748,404
		0,217	75,558					
		0,219	76,595					
		0,227	79,595					
		0,23	80,706					
	Pasient 4	0,223	77,854					
		0,517	186,99	171,047	9,204	5,4	50	8552,353
		0,457	164,77					
		0,446	160,659					
		0,485	175,028					
		0,468	168,733					
		0,472	170,103					

FORSØK 3 12. MAI 2005	158+	0,002	-19,216	-19,683	0,659	3,3	10	-196,825
		0,001	-20,149					
	158-	0	-20,382	-20,382	0	0	4	-81,527
	161+	0,147	65,043	65,043	0	0	4	260,173
	161-	0	-20,265	-20,265	0	0	4	-81,061
	162+	0,205	99,132	99,132	0	0	4	396,527
	162-	0,004	-18,459	-18,459	0	0	4	-73,835
FORSØK 4 25. MAI 2005	151+	0,237	107,924	103,078	4,371	4,2	10	1030,777
		0,224	101,878					
		0,219	99,431					
	151-	0,001	-5,214	-5,214	0	0	4	-20,856
	152+	0,267	122,222	120,319	1,724	1,4	10	1203,186
		0,262	119,871					
		0,26	118,863					
	152-	0	-5,454	-5,454	0	0	4	-21,815
	153+	0,283	130,043	126,38	6,385	5,1	10	1263,801
		0,283	130,091					
		0,26	119,007					
	153-	0,002	-4,638	-4,638	0	0	4	-18,553
	154+	0,185	83,022	83,822	0,843	1	10	838,216
		0,188	84,701					
		0,186	83,742					
	154-	-0,001	-5,982	-5,982	0	0	4	-23,926
	155+	0,249	114,017	113,266	3,586	3,2	10	1132,655
		0,254	116,416					
		0,24	109,363					
	155-	0,002	-4,59	-4,59	0	0	4	-18,361
	158+	0,285	131,098	129,979	1,104	0,8	10	1299,786
		0,283	129,947					
		0,28	128,891					
	158-	0,004	-3,583	-3,583	0	0	4	-14,33
	163+	0,229	104,037	106,116	2,632	2,5	10	1061,164
		0,231	105,237					
		0,239	109,075					
	163-	0,001	-5,262	-5,262	0	0	4	-21,048
FORSØK 5 1. JUNI 2005	168-	0,008	-8,81	-10,26	2,051	20	4	-41,042
		0,002	-11,711					
	168+	0,42	169,32	186,744	13,778	7,4	10	1867,435
		0,418	168,714					
		0,464	188,54					
		0,517	211,18					
		0,469	190,531					
		0,458	185,986					
		0,448	181,614					
		0,428	173					
		0,479	195,12					
		0,429	173,216					
		0,469	190,748					
		0,485	197,414					
		0,441	178,627					
		0,515	210,4					

Øyvind Steinsbø - resultater

<u>Forsøk</u>								
	<u>Prøve</u>	<u>Absorbanse</u>	<u>TNF-α- konsentrasjon</u>	<u>Gjennomsnitt</u>	<u>Standardavvik</u>	<u>Variasjonskoeffisi- ent</u>	<u>Uttynning</u>	<u>Adj.Result (Gjennomsnitt x Uttynning)</u>
FORSØK 1 17. JANUAR 2005	151+	0,308	132,828	133,372	9,301	7	10	1333,718
		0,331	142,932					
		0,288	124,355					
	151-	-0,004	-4,625	-4,625	0	0	4	-18,501
	152+	0,321	138,652	152,317	18,071	11,9	10	1523,166
		0,336	145,492					
		0,398	172,806					
	153+	0,364	157,538	160,421	3,303	2,1	10	1604,211
		0,369	159,7					
		0,378	164,025					
	154+	0,23	98,63	104,44	6,035	5,8	10	1044,397
		0,242	104,013					
		0,257	110,676					
	155+	0,374	161,907	166,422	7,975	4,8	10	1664,222
		0,373	161,73					
		0,405	175,63					
FORSØK 2 26. JANUAR 2005	Pasient 1	0,04	13,349	15,747	1,355	8,6	500	7873,503
		0,046	15,527					
		0,048	16,169					
		0,046	15,563					
		0,051	17,348					
		0,049	16,526					
		0,211	74,326	77,64	6,541	8,4	100	7764,049
	Pasient 2	0,229	80,681					
		0,249	87,893					
		0,201	70,756					
		0,204	71,827					
		0,228	80,36					
		0,234	82,573	90,725	11,068	12,2	100	9072,488
		0,257	90,713					
	Pasient 3	0,312	110,348					
		0,222	78,075					
		0,26	91,641					
		0,258	90,999					
		0,524	186,213	188,676	6,497	3,4	50	9433,814
		0,512	181,857					
		0,529	187,891					
	Pasient 4	0,565	200,6					
		0,521	185,106					
		0,536	190,39					

FORSØK 3 12. MAI 2005	158+	0,034	-21,982	-15,806	8,733	55,3	10	-158,061
		0,054	-9,631					
	158-	-0,019	-54,106	-54,106	0	0	4	-216,424
	161+	0,156	52,124	52,124	0	0	10	521,236
	161-	0,045	-15,289	-15,289	0	0	4	-61,156
	162+	0,222	92,522	92,522	0	0	10	925,224
	162-	-0,003	-44,615	-44,615	0	0	4	-178,459
FORSØK 4 25. MAI 2005	151+	0,206	100,49	98,12	2,053	2,1	10	981,203
		0,2	96,962					
		0,2	96,908					
	151-	0,003	-9,79	-9,79	0	0	4	-39,16
	152+	0,262	130,394	124,333	5,377	4,3	10	1243,335
		0,243	120,136					
		0,247	122,47					
	152-	0,001	-11,255	-11,255	0	0	4	-45,021
	153+	0,261	130,014	125,582	4,478	3,6	10	1255,817
		0,253	125,672					
		0,244	121,059					
	153-	-0,001	-12,069	-12,069	0	0	4	-48,278
	154+	0,177	84,534	87,32	2,53	2,9	10	873,202
		0,183	87,953					
		0,186	89,473					
	154-	0	-11,472	-11,472	0	0	4	-45,89
	155+	0,25	124,044	119,196	4,288	3,6	10	1191,958
		0,238	117,64					
		0,235	115,903					
	155-	0,002	-10,224	-10,224	0	0	4	-40,897
	158+	0,291	146,458	141,954	3,909	2,8	10	1419,537
		0,278	139,457					
		0,279	139,946					
	158-	0,004	-9,573	-9,573	0	0	4	-38,292
	163+	0,239	118,291	126,522	9,109	7,2	10	1265,225
		0,272	136,309					
		0,252	124,967					
	163-	0,003	-9,953	-9,953	0	0	4	-39,811
FORSØK 5 1. JUNI 2005	168-	-0,002	-8,977	-9,256	0,394	4,3	4	-37,025
		-0,003	-9,535					
	168+	0,48	197,554	180,926	11,796	6,5	10	1809,26
		0,473	194,508					
		0,42	171,984					
		0,447	183,439					
		0,444	182,109					
		0,418	171,126					
		0,459	188,845					
	*	*						
		0,447	183,439					
	*	*						
		0,436	178,677					
		0,397	161,945					
		0,401	163,876					
		0,47	193,607					

* To paralleller av prøve EL 168+ i Forsøk 5 ble maskert da disse brønnene ble forurenset under forsøket.

-
- ⁱ Bogen B, Munte L.A. Immunologi. Oslo: Universitetsforlaget, 2002.
- ⁱⁱ Wiborg Møller A.-S. Induction of "early immediate genes" in purified human blood monocytes and in whole blood. Doktoravhandling. Oslo: Faculty of mathematics and natural sciences, Universitetet i Oslo, 2005.
- ⁱⁱⁱ Linton M F, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. International Journal of Obesity 2003; 27: 35-40.
- ^{iv} Murray P R et al. Medical Microbiology 4. ed. St. Louis: Mosby Inc, 2002.
- ^v Rossignol D P, Lynn M. Antagonism of *in vivo* and *ex vivo* response to endotoxin by E5564, a synthetic lipid A analogue. Journal of Endotoxin Research 2002; 8: 483-488.
- ^{vi} Miyake E et al. Essential role of MD-2 in B-cell responses to lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 distribution. Journal of Endotoxin Research 2002; 6: 449-452.
- ^{vii} Correia J S et al. Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor Complex. The Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 21129-21135.
- ^{viii} Akira S, Kiyoshi T, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature Publishing Group 2001; 2 no 8: 675-680.
- ^{ix} Shimazu R et al. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. J. Exp. Med 1999; 189 no 11: 1777-1782.
- ^x Moldaver L L, Rebecca M. Tumor Necrosis Factor[α] and The Development of Multiple Organ Failure. Critical Care Medicine 2000; 28 no 6: 21-58.
- ^{xi} Alberts B et al. Molecular biology of THE CELL 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- ^{xii} Haveman J W et al. The Central Role of Monocytes in The Path Of SEPSIS. The Netherlands Journal of Medicine 1999; 55: 132-141.
- ^{xiii} Lund P K et al. Isolation of monocytes from whole blood by density gradient centrifugation and counter-current elutriation followed by cryopreservation: six years' experience. Scan J Clin Lab Invest 2000; 60: 357-366.
- ^{xiv} Lund P K et al. The fate of monocytes during 24 h of culture as revealed by flow cytometry and electron microscopy. Journal of Immunological Methods 2002; 270: 63-76.
- ^{xv} Tatzber F et al. Dual method for the determination of peroxidase activity and total peroxides-iodides leads to a significant increase of peroxidase activity in human sera. Analytical Biochemistry 2003; 316: 147-153.
- ^{xvi} Carrigan S H, Scott G, Tabrizian M. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. Clinical Chemistry 2004; 50 no 8: 1301-1314.
- ^{xvii} Østerud B. The high responder of LPS induced tissue factor activity in monocytes by platelets and granulocytes. Platelets Research; 6: 119-125.